**ICS 11.220**

**CCS B 41**

**NY**

中华人民共和国农业行业标准

**NY/T XXX-202X**

**代替**NY/T 574-2002

地方流行性牛白血病诊断技术

Diagnostic techniques for enzootic bovine leukosis

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

**XXXX发布 XXXX实施**

**中华人民共和国农业农村部 发布**

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替NY/T 574-2002《地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》，与NY/T 574-2002相比，主要技术变化如下：

—— 增加了范围（见第1章）；

—— 增加了规范性引用文件（见第2章）；

—— 增加了流行病学及临床症状（见第3章）；

—— 增加了病原学方法（见第4章）；

—— 增加了血清学诊断（见第5章）；

—— 增加了综合判定（见第6章）；

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件主要起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、重庆市动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、陕西省动物疫病预防控制中心、陕西省动物卫生与屠宰管理站。

本文件主要起草人：孙雨、王传彬、顾小雪、翟新验、杨林、刘颖昳、徐琦、毕一鸣、蔡金山、阚威、王新杰、孙晓明、高姗姗、白雪冬、曾政、董春霞、骆璐、赵洪进、王建、杨显超、陈斌、陈弟诗、赵光明、朱宝、齐亚辉、孙航、胡冬梅、冯冰。

本文件的历次版本发布情况为：

——NY/T 574-2002《地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》

引  言

地方流行性牛白血病（Enzootic bovine leukosis，EBL)也称为牛白血病（Bovine leukosis，BL)是由牛白血病病毒（Bovine leukaemia virus，BLV）引起的以淋巴样细胞恶性增生，进行性恶病质变化和全身淋巴结肿大为特征的一种慢性、进行性、接触传染性肿瘤病。该病于19世纪在欧洲首次发现，20世纪上半叶传至美洲大陆，现已呈世界性分布，我国《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为三类动物疫病。BLV感染通常是亚临床性感染，即不表现出临床症状，只有30%~70%的感染牛会发展为持续的淋巴细胞增多症，0.1%~10％的被感染动物会发展为肿瘤。EBL的临床体征取决于肿瘤的部位，可表现消化紊乱、食欲不振、消瘦、体虚、乏力等临床症状，偶有神经症状，当伴有严重的恶性消耗性症状时与牛结核、牛副结核等病的临床症状较为相似，应作实验室鉴别诊断。

BLV是一种外源性逆转录病毒，在结构和功能上与灵长类T淋巴病毒1、2和3（STLV-1，-2，-3）和人T淋巴病毒1和2（HTLV-1和-2）相关。病毒颗粒包括两个正义的单链RNA，编码核蛋白p12，衣壳（核心）蛋白p24，跨膜糖蛋白gp30，包膜糖蛋白gp51和几种酶（包括逆转录酶）。BLV的主要靶细胞是B淋巴细胞，被感染的动物会终身带毒，并引起广泛的免疫功能异常，从而导致产奶量降低、产肉量下降和流产，会对牛场造成较大的经济损失。由病毒基因组反转录形成的前病毒DNA和宿主细胞的DNA随机整合，在不持续产生病毒后代的情况下，终生存在于宿主细胞染色体中。因此，检出外周血单核细胞（PBMC）中的BLV前病毒DNA可作为牛感染BLV的证据。

本文件参考了WOAH《陆生动物诊断试剂和疫苗使用手册》的有关内容，技术方法与WOAH推荐的方法一致。其中病毒分离适用于从外周血单个核细胞培养物中分离BLV，可用于临床诊断；聚合酶链式反应（PCR）（包括巢式PCR和实时荧光定量PCR两种方法）可以检测感染动物组织或PBMC中的BLV的前病毒DNA；酶联免疫吸附试验（ELISA）适用于检测奶或血清中的抗体，琼脂凝胶免疫扩散（AGID）适用于检测血清中的抗体。

地方流行性牛白血病诊断技术

1. 范围

本文件规定了牛白血病的临床诊断、样品采集与处理、病原学和血清学方法的技术要求。

本文件适用于牛白血病的诊断、检测、检疫、监测和流行病学调查。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款，其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求。

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件：

* 1. 地方流行性牛白血病（enzootic bovine leukosis，EBL)

是一种以淋巴样细胞恶性增生，进行性恶病质变化和全身淋巴结肿大为特征的一种慢性、进行性、接触传染性肿瘤病，由反录病毒科、肿瘤病毒亚科中的牛白血病病毒（Bovine leukaemia virus，BLV）引起。

* 1. 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）

是利用一段DNA为模板，在DNA聚合酶和核苷酸底物共同参与下，将该段DNA扩增至足够数量，以便进行结构和功能分析。

* 1. 实时荧光PCR（real-time PCR）

是一种利用荧光信号、累积实时监测整个PCR进程的试验方法。

* 1. Ct值（cycle threshold）

每个实时荧光PCR反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数。

* 1. 琼脂凝胶免疫扩散（agar gel immunodiffusion，AGID）

简称琼扩试验，是在琼脂凝胶中进行的抗原抗体免疫沉淀反应，可用于血清学定型。

* 1. 酶联免疫吸附试验 ( enzyme-linked immunosorbent assay ，ELISA)

酶联免疫吸附试验是由酶分子与抗体分子共价结合形成酶标记抗体，此种结合不会改变抗体的免疫学特性，也不影响酶的生物学活性。通过此种酶标记抗体与吸附在固相载体上的抗原发生特异性结合，当加入底物溶液后，底物可在酶作用下出现显色反应，此种显色反应可通过酶标仪进行定量测定，从而通过底物的显色反应来判定有无相应的免疫反应。

1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

PBS：磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

PBMC：外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell)

FBL：胎牛肺细胞（fetal bovine lung）

MEM：最低必需培养基（minimum essential medium）

OD：光密度（optical density）

1. 临床诊断
   1. 易感动物

各年龄段牛（包括牦牛、水牛以及野生牛类）均易感，肿瘤（淋巴肉瘤）常见于3岁以上的牛。

* 1. 传播途径

牛的各种体液（鼻和支气管液，唾液，血液、精液、牛奶）中均存在BLV，可通过血源性传播、分泌物传播、乳源性传播、寄生虫传播、精液和胚胎移植传播等多种途径传播，亦可通过被血液污染的直肠检查用针头、手术设备、手套，吸血昆虫等机械性传播。

* 1. 临床症状
     1. 地方流行型

潜伏期一般为4-5年，多发生于3岁以上成年牛，4-8岁间牛感染率最高。最急性病例无前驱症状即死亡。亚急性病例病程多为7天至数月，表现为食欲减退、贫血和肌无力。当肿瘤广泛生长时，体温可升高至39.5-40℃，病牛表现为生长缓慢，全身体表淋巴结显著肿大而且坚硬，依部位不同可导致病牛头偏向一侧，眼球突出，严重时被挤出眼眶，有的出现贫血，心脏受损，消化功能紊乱，流产、难产或不孕，共济失调、麻痹等症状。

* + 1. 散发型

犊牛多见于4月龄以下，主要表现为淋巴结对称性肿大。青年牛多见于18-20月龄，出现全身淋巴结肿大，内脏特别是胸腺出现肿瘤，并伴有贫血和下痢，心和肝脏的肿瘤可导致病牛死亡。

* 1. 病理变化

剖检可见淋巴结和某些器官肿瘤病变，瘤块外观肿大、灰红色、坚实、有弹性。肿瘤的发生分布每例不一，成年牛多发体表淋巴结，膈肌、肠系膜、真胃、肌肉、心肌多有肿瘤病变。肿瘤的病理组织学表现为有致密的基质及淋巴细胞和成淋巴细胞的大量增殖，患病组织有大量瘤细胞浸润、破坏并代替正常的组织细胞。

* 1. 结果判定

易感动物符合5.3、5.4的规定，可初步判定为疑似病例。确诊应采集易感动物的血液或组织进行病原学或血清学检测。

1. 样品采集、保存与运输
   1. 总则

宜选择EBL发病期、具有典型临床症状的牛，进行样品采集。采样过程中，应避免交叉污染。样品采集、保存及运输应符合GB 19489的要求。

* 1. 样品采集
     1. 抗凝血样品采集

采集牛静脉抗凝血5 mL，来回颠倒几次，使抗凝剂与血液充分混合。使用商品化核酸提取试剂，提取抗凝血中的PBMC。

* + 1. 组织器官样品采集

无菌采集典型肿瘤病变组织0.5 g～1.0 g左右，置于无菌采样袋或其它灭菌容器中，密封保存。

* + 1. 血清样品采集

无菌采集牛静脉血约5mL，分离血清。将血清置于2mL无菌离心管中，加盖密封保存。

* 1. 样品保存和运输

样品采集后，应尽快置保温箱中，加人预冷的冰袋，密封，宜24 h内送实验室检测。待检样品应尽快处理，在4 ℃存放应不超过4 d。样品在低温条件下保存时间稍长；样品若长期保存，应-70 ℃以下条件为宜。

* 1. 样品处理
     1. 抗凝血样品处理

使用商品化PBMC细胞提取试剂，提取抗凝血中的PBMC。

* + 1. 组织器官样品处理

加入0.5 mL～1 mL 0.01 mol/L的PBS(pH 7.2)，于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨，将组织悬液转入无菌离心管中备用。

* + 1. 血清样品处理

血清样品以6 000 r/min离心5 min，取上清液待检。

1. 病原分离
   1. 基本要求

除特殊说明外，本文件所有操作程序均应符合GB 19489的规定。

* 1. 试剂耗材
     1. 除特殊说明外，本文件使用的化学试剂均分析纯，水均为符合GB/T 6682标准的二级水。
     2. 商品化Ficoll Pague PLUS提取试剂。
     3. 商品化MEM培养基。
  2. 病原分离与鉴定
  3. 采用PBMC和指示细胞共培养，通过刺激有丝分裂原产生感染性的病毒。将1.5 mL外周血置于乙二胺四乙酸中，用聚蔗糖/甲基泛影酸钠密度梯度法离心分离PBMC或用商品化Ficoll Pague PLUS提取试剂盒提取PBMC。用2×106的FBL细胞培养PBMC，置于40 mL含20%胎牛血清的MEM中，生长3~4天。病毒在FBL细胞的单层细胞中发育，导致合胞体的形成。制备短期培养物，可将PBMC置于无FBL的培养基中，于24孔板中培养3天。取培养物的上清液，采用PCR方法和实时荧光PCR方法检测BLV前病毒。

1. 巢式PCR
   1. 试剂耗材
      1. 商品化DNA提取试剂盒。
      2. 商品化10×PCR缓冲液。
      3. DL2 000 marker。
      4. 50×TAE缓冲液（配制方法见附录A.1）。
      5. 2%琼脂糖凝胶（配制方法见附录A.2）。
      6. 商品化无RNA酶水。
      7. 6X上样缓冲液。
      8. 微量可调移液器（10 μL~100 μL，20 μL ~200 μL，100 μL ~1000 μL）以及相应滤芯吸头。
      9. 0.2 mL PCR管。
   2. 仪器设备
      1. PCR扩增仪。
      2. 台式离心机。
      3. 电泳仪。
      4. 普通冰箱（-20 ℃）。
      5. II级生物安全柜
   3. 引物序列

鉴定env基因的引物序列及其PCR产物长度见表1。

表1 鉴定env基因的引物序列及其PCR产物长度

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **引物名称** | **序列** | **长度** | **扩增片段大小** |
| BLV-env-1 | TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA | 22 bp | 598 bp |
| BLV-env-2 | AACAACAACCTCTGGGAAGGG | 21 bp |
| BLV-env-3 | CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT | 22 bp | 444 bp |
| BLV-env-4 | GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG | 22 bp |

* 1. 对照样品

阳性对照：含有目的基因片段的质粒或者病毒分离培养物。

阴性对照：无RNA酶水。

* 1. 实验步骤
     1. DNA提取

按商品化DNA提取试剂盒的操作说明书，分别提取待检样品、阳性对照、阴性对照DNA，置于-20 ℃冰箱中备用。

* + 1. 巢式PCR反应

巢式PCR反应第一轮扩增体系见表2。

表2 第一轮PCR扩增体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组成 | 体积（μL） |
| 10x PCR缓冲液 | 5 |
| 引物BLV-env-1（20 pmol/μL） | 1.25 |
| 引物BLV-env-2（20 pmol/μL） | 1.25 |
| dNTP（每个2 5mM） | 0.15 |
| MgCl2（25 mM） | 3 |
| Taq聚合酶（1.25 U） | 0.25 |
| 蒸馏水 | 19.1 |
| 模板（约1 µg DNA） | 20 |
| 总计 | 50 |

巢式PCR反应第二轮扩增体系见表3。

表3 第二轮PCR扩增体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组成 | 体积（μL） |
| 10× PCR buffer | 5 |
| 引物BLV-env-3（20 pmol/μL） | 1.25 |
| 引物BLV-env-4（20 pmol/μL） | 1.25 |
| dNTP（每个25 mM） | 0.15 |
| MgCl2（25 mM） | 3 |
| Taq聚合酶（1.25 U） | 0.25 |
| 蒸馏水 | 36.1 |
| 模板（第一轮PCR产物） | 3 |
| 总计 | 50 |

第一轮PCR按如下条件进行PCR反应：94 ℃预变性2 min；95 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸60 s，30个循环；72℃终延伸4 min。扩增后产物加入第二轮PCR反应体系内，按如下条件进行PCR反应：94 ℃预变性2 min；95 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸60 s，30个循环；72 ℃终延伸4 min。

* + 1. 电泳

将10 μL巢式PCR产物和2 μL的上样缓冲液（6X）混合，点于2%的凝胶上（含有核酸染料）进行电泳，用分子量标准比较判断PCR片段大小。

* 1. 结果判定

BLV阳性对照出现444bp目的条带，且BLV阴性对照无相应条带，实验成立。

阳性样本和阳性对照片段大小为444 bp；阴性样本无444 bp目的片段。

为了进一步验证检测结果，可将PCR产物进行测序，如果测序结果与目的基因序列一致，则判该样品中含有BLV。

1. 实时荧光PCR
   1. 试剂耗材
      1. 商品化DNA提取试剂盒。
      2. 商品化2X实时荧光定量PCR预混液（2X PCR master mix）。
      3. 微量可调移液器（10 μL~100 μL，20 μL ~200 μL，100 μL ~1000 μL）以及相应滤芯吸头。
      4. 实时荧光定量PCR扩增管
   2. 仪器设备
      1. 实时荧光定量PCR扩增仪。
      2. 台式高速离心机。
      3. 微量可调移液器（10 μL～100 μL，20 μL～200 μL，100 μL～1000 μL）以及相应滤芯吸头。
   3. 引物探针

鉴定pol基因的引物探针序列及其实时荧光PCR产物长度见表4。

表4 pol基因的引物探针序列及其实时荧光PCR产物长度

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **引物名称** | **序列** | **引物长度** | **扩增片段大小** |
| MRBLVL | CCTCAATTCCCTTTAAACTA | 20 bp | 120 bp |
| MRBLVR | GTACCGGGAAGACTGGATTA | 20 bp |
| MRBLV probe | 5’-FAM-GAACGCCTCCAGGCCCTTCA-BHQ1-3’ | 20 bp |

* 1. 实验步骤
     1. 核酸提取

步骤同8.5.1 。

实时荧光PCR扩增体系见表5。

表5 实时荧光PCR扩增体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组成 | 体积（μL） |
| 2× PCR master mix | 12.5 |
| 引物MRBLVL（10 μmol/L） | 1 |
| 引物MRBLVR（10 μmol/L） | 1 |
| MRBLV probe（10 μmol/L） | 0.5 |
| 模板（基因组DNA，500 ng） | X(一般为5) |
| 双蒸水 | 10-X |
| 总计 | 25 |

* + 1. 反应程序

95 ℃ 15min，1个循环；94 ℃ 60 s，60 ℃ 60 s，50个循环，在每次循环的退火时收集荧光。

* 1. 结果判定

阳性对照Ct值≤40，且出现特征性扩增曲线，阴性对照无Ct值，且无特征性扩增曲线，试验成立。被检样品Ct小于或等于40判定为BLV核酸阳性；阴性样品是没有Ct值或Ct值大于50判定为BLV核酸阴性；被检样品40＜Ct值≤50且出现特征性扩增曲线，样品检测结果判为疑似，疑似样品应重新检测，仍为疑似，判定为 BLV核酸阳性

1. 阻断ELISA
   1. 试剂耗材
      1. 包被抗原：BLV-gp51抗原。
      2. 对照血清：BLV阴性对照血清、BLV阳性对照血清。
      3. 浓缩酶标抗体：抗gp51辣根过氧化物酶标记物。
      4. 10×浓缩洗涤液（配制方法见附录D.1）。
      5. 底物液（配制方法见附录D.2）。
      6. 终止液（配制方法见附录D.3）。
      7. 微量可调移液器（10 μL～100 μL，20 μL～20 0μL，100 μL～1000 μL）及相应滤芯吸头。
      8. 八通道移液器（50 μL～300 μL）及相应滤芯吸头。
      9. 96孔酶标板。
   2. 仪器设备
      1. 酶标仪。
      2. 恒温培养箱。
      3. 洗板机。
      4. 台式离心机。
   3. 实验操作
      1. 加样

取出包被板，在每个反应孔中加入50 μL稀释液，在2个阴性对照孔和2个阳性对照孔中分别加入阴性对照血清和阳性对照血清，每孔各50 μL。在待测样品孔中加入50μL未稀释的牛血清样品。

* + 1. 孵育

震荡混匀，盖上封板膜，18 ℃～26 ℃孵育30 min（±3 min）。

* + 1. 洗板

弃去包被板中液体，用300 μL的洗涤液，每个孔洗涤3次。在每一次洗涤后，吸去每个板孔中的液体，在最后一次甩掉后，在吸水材料上用力扣板，吸去剩余的液体。

* + 1. 加入酶标抗体

每孔加入100 μL用洗涤液100倍稀释的酶标抗体，盖上封板膜，18 ℃～26 ℃孵育60 min（±5 min）。

* + 1. 洗板

按10.3.3方法洗板。

* + 1. 加底物

每孔加入100 μL底物液，18 ℃～26 ℃避光孵育20 min(±3 min)。

* + 1. 反应终止

每孔加入100 μL终止液。

* + 1. 读取吸光度

在450 nm条件下，测量并记录每个样品和对照的OD值。

* 1. 实验结果判定
     1. 结果计算

阴性对照OD平均值（NC ）=( NC1+NC2 )/2

阳性对照OD平均值（PC ）=( PC1+PC2 )/2

S/N%=100×样品/NC

* + 1. 实验成立条件

NC≥0.6；PC/NC≤0.2

* + 1. 结果判定

S/N%≥40，判定为BLV抗体阴性；S/N%<40，判定为BLV抗体阳性。

1. 琼脂凝胶免疫扩散（AGID）
   1. 试剂耗材
      1. 抗原：含有BLV的特异性糖蛋白gp51 。
      2. 对照血清：BLV阴性对照血清、BLV弱阳性对照血清、BLV阳性对照血清。
      3. 试剂级琼脂糖。
      4. 8.5% NaCl的0.2 M Tris缓冲液（pH 7.2）（配制方法见附录E.1）。
      5. 微量可调移液器（10 μL ~100 μL，20 μL ~200 μL，100 μL ~1000 μL）及相应滤芯吸头。
   2. 仪器设备
      1. 培养皿。
      2. 恒温培养箱。
      3. 水浴锅或微波炉。
      4. 六边形打孔器(内径5 mm)。
      5. 电子天平（0.1 mg）
      6. 4 ℃冰箱
   3. 实验操作
      1. 琼脂平板制备

琼脂在水浴锅或微波炉内加热融化，每平皿（直径8.5 cm)倒15 mL，4 ℃冰箱冷却凝固。

* + 1. 打孔

用六边形打孔器打1个中心孔及其外周呈六边形排列的6个孔并封底。

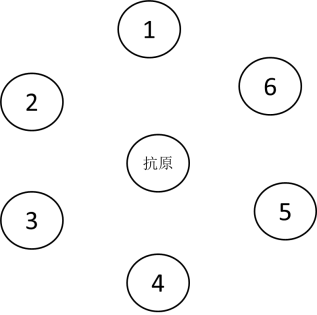


图1 琼脂凝胶平板打孔编号图示

* + 1. 加样

中央孔加入BLV抗原，1、3、5孔分别加入待检血清样品，2、4、6孔加入标准阳性血清。加至孔满为止，平皿加盖

* + 1. 孵育

将平皿盖上平皿盖，放入湿盒内。将湿盒置于20 ℃～27 ℃培养，分别在24 h、48 h、72 h读取结果。

* + 1. 实验成立条件

阳性对照血清孔与抗原孔之间形成一条清晰、致密的白色沉淀线，弱阳性对照血清孔与抗原之间形成一条比较清晰、但不致密的白色沉淀线，试验有效。如果阳性对照不产生预期结果，则试验无效。

* + 1. 结果判定

待测血清与抗原形成一条特异性沉淀线，并与阳性对照血清形成的线一致，则判为BLV抗体阳性。待测血清使阳性对照血清线向抗原孔弯曲，但不与抗原形成可见的沉淀线，则为BLV抗体弱阳性。待测血清与抗原没有形成一条特异性沉淀线，并且不使阳性对照血清线弯曲，则为BLV抗体阴性。

1. 综合判定

符合5.5，且8.6、9.5、10.4.3、11.3.6任何一项阳性者，判定为牛白血病。

1. （规范性附录）  
   PCR试验用溶液的配制
   1. 50×TAE电泳缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| Tris | 242 g 2 mol |
| Na2.EDTA.2H2O | 37.2 g 0.1 mol |

加入去离子水800 mL，充分搅拌溶解。

加入57.1 ml的冰乙酸，充分溶解。

加去离子水定容至1 L。

* 1. 1×TAE电泳缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| 50×TAE电泳缓冲液 | 4 mL |
| 去离子水 | 196 mL |

混合后充分搅拌均匀

* 1. 2%琼脂糖凝胶

|  |  |
| --- | --- |
| 琼脂糖（电泳级） | 2 g |
| TAE电泳缓冲液（1×） | 100 mL |

在三角锥形瓶中加入上述成分， 在微波炉中溶解琼脂糖，待沸腾溶解后加入核酸染料，摇动使染料均匀分布于胶液中，然后倒胶，待其凝固后即可使用。

1. （资料性附录）  
   巢式PCR方法的特异性片段
   1. BLV env基因第一轮扩增片段序列

TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGGTTCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCCTCGCCCTCCCGGACGCCCAAATCTTCTGGGTCAACTCGTCCTCGTTTAACACCACCCAAGGATGGCACCACCCTTCCCAGAGGTTGTTGTT

* 1. BLV env基因第二轮扩增片段序列

CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGGTTCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCCTCGC

1. （资料性附录）  
   实时荧光PCR方法的特性性片段
   1. 实时PCR的扩增片段序列

CCTCAATTCCCTTTAAACTAGAACGCCTCCAGGCCCTTCAAGACCTGGTCCATCGCTCTCTGGAGGCAGGTTATATCTCCCCCTGGGACGGGCCAGGCAATAATCCAGTCTTCCCGGTAC

1. （规范性附录）  
   阻断ELISA溶液的配制
   1. 10×浓缩洗涤液

称取Na2HPO4•12H2O 29 g、KH2PO4 2 g、NaCl 80 g、KCl 2 g，加入80 0mL灭菌纯化水搅拌溶解，再加入1 mL ProClin 300、10 mL的吐温20，加灭菌纯化水定容至1000 mL，过滤除菌，2 ℃～8 ℃保存。使用前将10×浓缩洗涤液用蒸馏水（或去离子水）10倍稀释，即1份10倍浓缩洗涤液加9份蒸馏水（或去离子水）。例如：50 mL10倍浓缩洗涤液加入450 mL蒸馏水（或去离子水）。

* 1. 底物液

A液：

称取柠檬酸5.76 g、过氧化脲 0.5 g、乙酸钠6.21 g，加入800 mL灭菌纯化水搅拌溶解，再加入ProClin 300 0.5 mL，而后加纯化水定容至1000 mL，过滤除菌，2 ℃～8 ℃保存。

B液：

称取柠檬酸5.76 g、TMB 0.2 g，加入甲醇100 mL溶解，再加入ProClin 300 ml 0.5 mL，最后加灭菌纯化水定容至1000 mL，过滤除菌，2 ℃～8 ℃避光保存。

A、B液等体积混匀即为底物液。

* 1. 终止液（0.5 M硫酸）

量取灭菌纯化水800 mL，缓慢加入浓硫酸（18.4 mol/L）27.2 mL，搅拌均匀，而后加灭菌纯化水定容至1000 mL，2 ℃～8 ℃保存。

1. （规范性附录）  
   琼脂凝胶免疫扩散溶液的配制
   1. 8.5%NaCl的0.2 M Tris缓冲液（pH7.2）

称取三羟甲基氨基甲苯（Tris methylamine） 24.33 g加灭菌纯化水定容至1000 mL，2.5 M盐酸调pH至7.2。NaCl 85 g溶于250 mL Tris/HCl，加灭菌纯化水定容至1000 mL。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_